

SUMO によるタンパク質修飾

磯貝 信, 白川 昌宏

ユビキチン様タンパク質によるタンパク質の修飾は多様なタンパク質の翻訳後修飾の中でも、修飾基の分子量の大きさ、修飾基も被修飾基もタンパク質であるという点で特異である。small ubiquitin-like modifier (SUMO) はユビキチン様タンパク質の中でもユビキチンに次いで研究が進んでおり、特に最近の機能・構造研究の進展が著しい。本稿では核内制御を中心とした SUMO 修飾の役割を構造生物学的な知見を交えて紹介していきたい。

1. タンパク質の翻訳後修飾

タンパク質の翻訳後修飾は、低分子量化合物や官能基による修飾とユビキチン様タンパク質による修飾の二つに大別できる。低分子量の修飾子としては、リン酸基、メチル基、アセチル基、糖鎖、脂質、ニトリル基などが挙げられる。これらの修飾は、タンパク質-タンパク質相互作用や酵素活性の制御、輸送タグとしての機能、細胞内局在性の変化、細胞内シグナル伝達などにおいて様々な機能を果たす。これらは多くの場合、タンパク質の表面の環境を変化させることで、その機能を発揮していると捉えることができる。例えばセリン、トレオニン、チロシンのリン酸化では、負電荷の付加によりタンパク質表面に静電的相互作用やイオン結合性や水素結合の受容基を付与しうる。一方、ユビキチン様タンパク質 (ubiquitin-like protein: UBL) による修飾は、修飾基の分子量が大きいことから、被修飾タンパク質の表面環境の加工と捉えるのは妥当ではなく、修飾子タンパク質が他のタンパク質等との独立した結合タグとして機能するなど、高次の作用機序が想定されうる。本稿では UBL のうちユビキチンに次いで研究が進んでいる small ubiquitin-like modifier (SUMO)¹⁾を取り上げ、最近の

研究の動向を概説する。

2. SUMO

UBL タンパク質は、比較的多様性に富んだアミノ酸配列を持つが、ユビキチンフォールドまたは β -grasp フォールドと呼ばれる共通の立体構造を持つ。UBL タンパク質には、前述のように他のタンパク質、脂質などに対してイソペプチド結合を介した修飾基として働きうる I 型 UBL (ユビキチンフォールド部位を C 末端に持つ分子量が 8,000~18,000 程度のタンパク質、中にはユビキチンフォールドを二つ持つものもある。)と、修飾基として働かない II 型 UBL (多くの場合、マルチドメインタンパク質の一つのドメインとして存在する) に大別される²⁾ (表 1)。SUMO は I 型 UBL に属し、酵母以上の真核生物に広く見られる。酵母には一つのアイソフォームしか見つかっていないのに対して、ヒトには四つの SUMO (1-4) のアイソフォームが存在する。これら SUMO アイソフォームのユビキチンとの配列相同性は軒並み十数%程度であるが、UBL タンパク質の特徴であるユビキチンフォールドを保存しているため立体構造上の差異は少ない。但しユビキチンと比較して SUMO は 10 残基程度の N 末端テイルを持つこと、表面電荷が全体的に中性であるユビキチンに対して SUMO は負に帯電していること、が差異として挙げられる。SUMO アイソフォーム間の一次構造比較では、SUMO-1 に対して SUMO-2, 3, 4 はおおよそどれも配列相同性が 40% 程度と低く、SUMO-2, 3, 4 間の成熟体の配列相同性は 97%, 84% と高い。特に SUMO-2 および 3 はユビキチンフォールド部分において 100% の相同性を示し、差異は N 末端の伸長領域の数残基のみに見られる。

京都大学大学院工学研究科分子工学専攻生体分子機能化学講座 (〒615-8510 京都府京都市西京区京都大学桂)

Protein modification by SUMO

Shin Isogai and Masahiro Shirakawa (Biomolecular Function Chemistry, Department of Molecular Engineering, Graduate School of Engineering, Kyoto University, Kyotodaigaku-Katsura, Nishikyo-ku, Kyoto 615-8510, Japan)

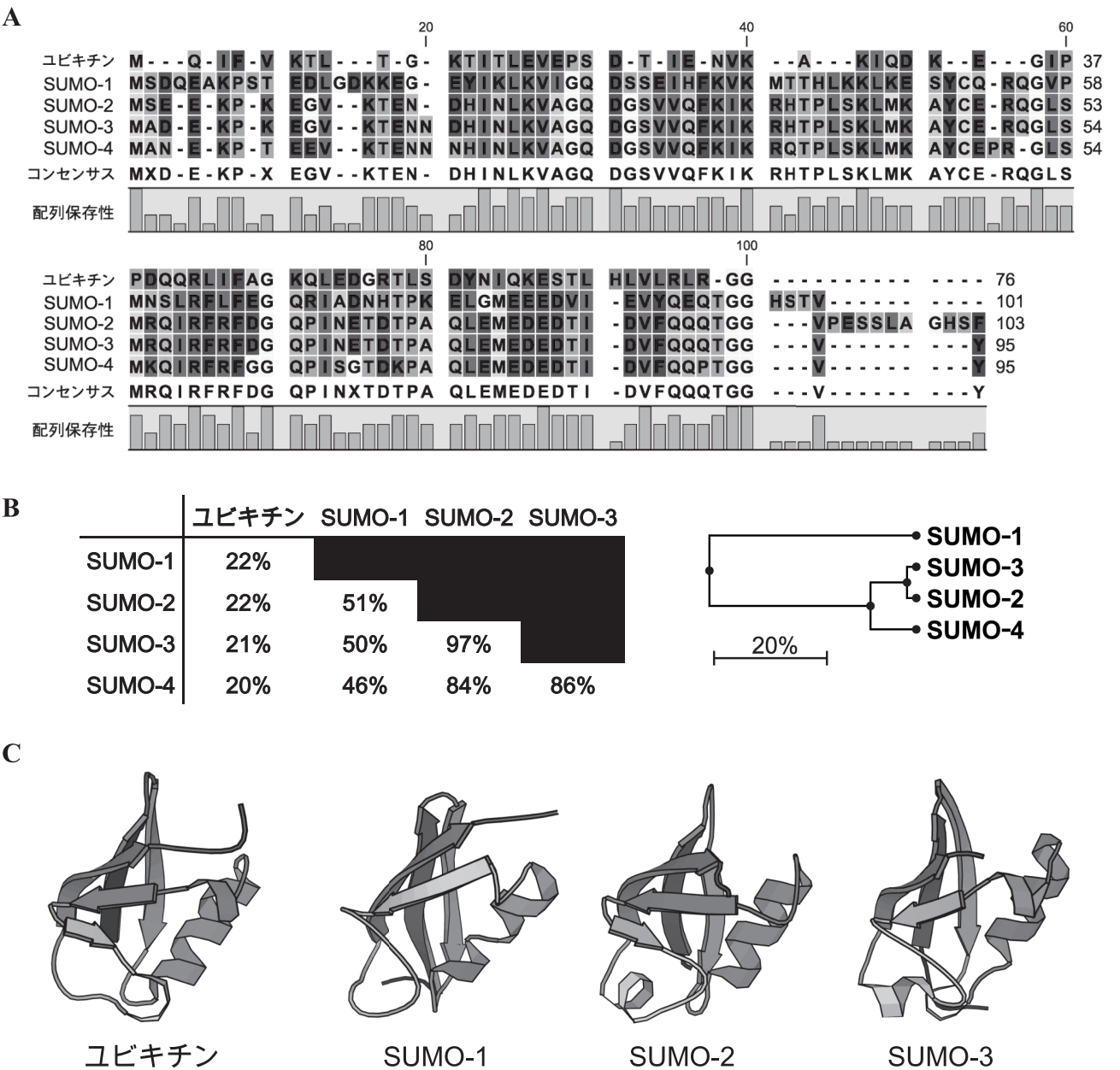


図1 SUMOとユビキチンの配列相同性と全体構造の類似性
(A) ユビキチンとSUMOアイソフォームの配列アラインメント. アラインメントはClustalWにて行った. (B) 配列相同性とSUMOアイソフォーム間の一次配列の相関性. アラインメントを行った全配列に対してGly-Gly末端までの配列について相同性を計算し, 表および相関図に示した. (C) ユビキチンとSUMOアイソフォームのユビキチンフォールド部分の立体構造の比較. ユビキチン(PDB 1ubq), SUMO-1 (1a5r), SUMO-2 (1u4a), SUMO-3 (1wm2)

ただし, SUMO-4は前駆体のC末端プロセシング反応が90番目のプロリン残基により阻害され, 修飾因子として働くことができない³⁾ (図1).

3. UBL修飾サイクル

SUMOを含むUBLによる修飾反応は共通してE1-E2-E3カスケードにより触媒される. E1-E2-E3カスケードは, UBLのC末端へのATPによるアデニレーション反応から

始まるが, このATP加水分解エネルギーはサイクル全体のエネルギーを供給している. E1-E2-E3カスケードは, ATPの加水分解およびUBL~E1チオエステルの形成によりUBLを活性化するE1活性化酵素(E1酵素), E1酵素からUBLを自己のシステイン残基に受け取り, 基質への受け渡しを行うE2結合酵素(E2酵素)と付加反応の促進および特異性を向上させるE3リガーゼ(E3酵素)の三つにより成り立っている(図2). 修飾サイクルの反応コン

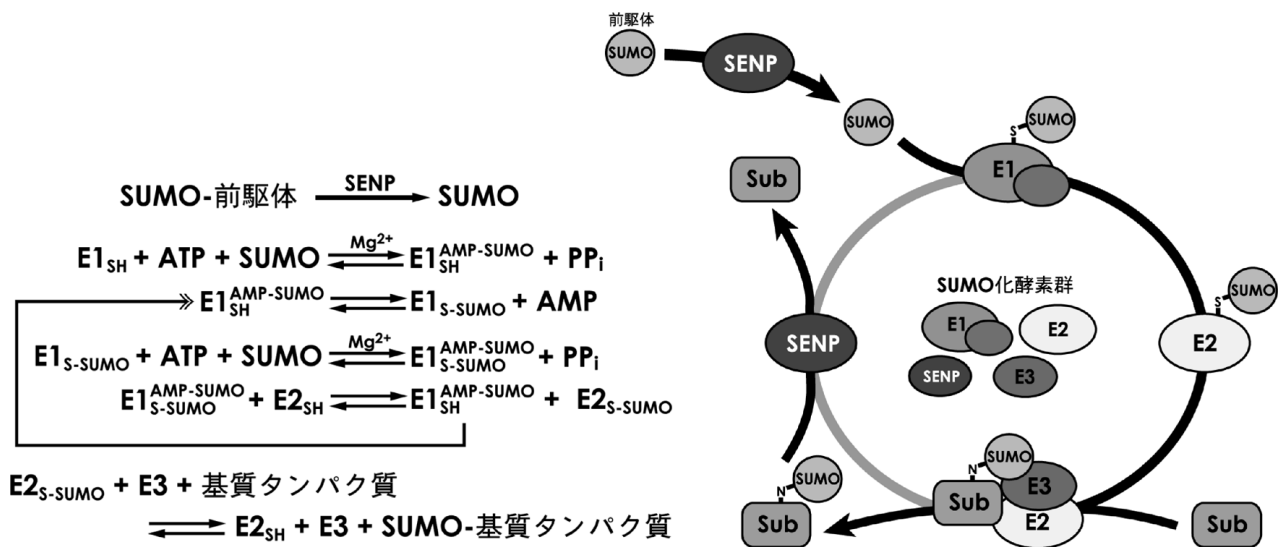


図 2 SUMO 化サイクル

E1-E2-E3 カスケードは、UBL の C 末端への ATP によるアデニレーション反応から始まる。この UBL~AMP 高エネルギー結合は、AMP の放出とともに解離し、E1 酵素のシステイン残基との UBL-E1 チオエステル複合体の形成へとつなげる。その後、この UBL は E2 酵素上のシステイン残基とのチオエステル結合として受け渡され、最終的に E3 酵素と共役してより安定な基質タンパク質上のアミノ基とのアミノエステル結合を形成する。

表 1 UBL タンパク質の種類と修飾酵素群

I 型 UBL	配列相同性	E1	E2	E3	脱修飾酵素
ユビキチン	100	Uba1, Uba6	Ubc1-8, 10, 11, Ubc13-Mms2	多種 (RING 型, HECT 型)	多種
SUMO-1/2/3/4/ Smt3	12	Uba2-Aos1	Ubc9	PIAS 類, RanBP2, Pc2	Senp/Ulp
Nedd8/Rub1	49	Uba3-Ula1	Ubc12	Dcn1	Yuh1, Cop9, signalosome
ISG15	40	UbeL1	UbcH8	Herc5, Efp	Ubp43
Atg8	—	Atg7	Atg3		Atg4
Atg12	—	Atg7	Atg10		
Urm1	18	Uba4			
Ufm1	—	Uba5	Ufc1		
Fat10	26				
Fau	25				
Hub1	20				
—：記述なし					
II 型 UBL					
Bat3	41				
ubiquilin	40				
Dsk2	33				
Parkin	32				
Rad23	27				
GDX	27				
elongin B	22				
HCG1	18				
USP	18				
OAS	17				
APG8	14				
elongin C	11				
Bag	10				

ポーネントは E1-E2-E3 と反応ステージが進むにつれて酵素の多様性が増大するピラミッド型をとり、多種多様な基質タンパク質に対して対応して反応を進めることを可能にしている⁴⁾ (表 1)。

4. E1 酵 素

UBL はそれぞれ一つずつの E1 酵素を持っている (ユビキチンのみ、ごく最近ウニの Uba6 が従来の Uba1 に加えて新しくユビキチンの E1 として同定された)。E1-E2-E3 カスケードにおける E1 酵素の役割は ATP と UBL の C 末

端とのアデニル化反応、生成した UBL~AMP の UBL~E1 チオエステルへの転移、最後に E2 酵素への UBL の受け渡し、の三つの段階を触媒する。これらの反応を触媒するための構造ドメインとして、ATP を結合し、アデニル化を行うアデニル化ドメイン、チオエステル活性残基を持つ Cys ドメイン、ユビキチンフォールドを持つ ubiquitin fold (UF) ドメインが存在し、アデニル化ドメインの活性中心を Cys ドメインおよび UF ドメインが囲いこむ形で配置されている。E1 酵素に E2 酵素が結合した状態では UF ドメインは Cys ドメインから遠い場所へと移動する。これは

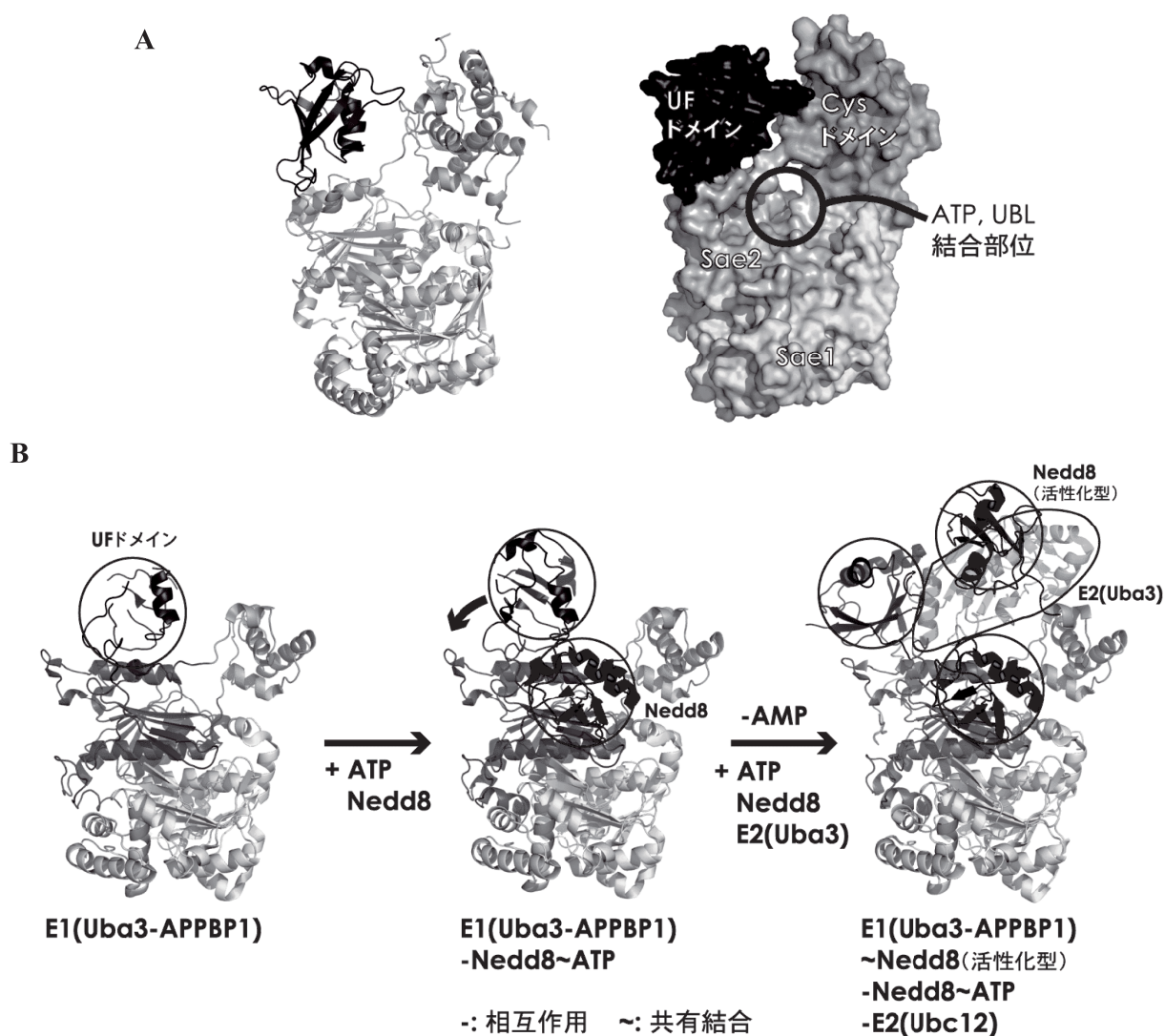


図 3 SUMO-E1 酵素の立体構造と Nedd8-E1 酵素の活性化機構

(A) SUMO-E1 酵素の立体構造とドメイン配置。SUMO-E1 酵素は Sae1/Sae2 のヘテロ複合体からなる。ATP, SUMO 結合部位は Sae2 にあり、Sae2 上の Cys ドメインおよび UBL ドメインに囲まれている。立体構造は Sae1/Sae2-ATP-SUMO 複合体 (PDB 1y8r) から SUMO を取り除いた構造を示した。

(B) Nedd8-E1 酵素による Nedd8 分子の活性化機構。Nedd8-E1 酵素は Uba3-APPBP1 ヘテロ複合体からなる。Nedd8 の活性化に際して Cys ドメイン結合型の活性化型 Nedd8 が形成されるには、UF ドメインがフリップアウトして Nedd8 および E2 (Ubc12) のための間隙が発生する必要がある。その様子を示した。構造は PDB ID, 1yow, 1r4n, 2nvu を用い、それぞれ APPBP1 の Nedd8 認識ドメインを除いたものを示した。

Cys ドメインとチオエステル結合した UBL が UF ドメインを押しつけ、UF ドメイン上の E2 酵素との相互作用表面が露出するようになるためである。これまでに決定された E1 酵素の立体構造においてこれら三つのドメイン配置はよく保存されており、UBL 全体を通して E1 酵素の基本的な活性化機構が保存されていることを示している⁵⁾ (図 3)。

5. E2 酵 素

E2 酵素は E1 酵素から UBL を自己活性残基へ受け取った後、E3 酵素と共役して基質タンパク質へと UBL を付加する。この点において、E2 酵素は修飾反応に関わるすべての因子と相互作用する中心的な分子と言えるが、比較的分子量は小さく SUMO の E2 酵素 ubiquitin conjugation enzyme 9 (Ubc9) で 157 残基、ユビキチンの E2 酵素で大きなものでも 300 残基を超えることはない。Ubc9 は基質タンパク質上の SUMO 化が行われる部位に特異的なコンセンサス配列に直接結合できるという特徴を持ち、E1-E2 酵素濃度が高い条件では *in vivo* においては E3 酵素との共役なしで多くの基質タンパク質のリジン残基に付加反応を起こすことができる。SUMO と Ubc9 は、チオエステル形成の際に用いられる相互作用表面に加えて、非共有結合的な相互作用表面を持つことが明らかになっている⁶⁾。非共有結合的な相互作用表面は、その相対的な位置が K63 リンクポリユビキチン鎖を作る E2 酵素である Ubc13/Mms2 とユビキチンの複合体に見られる相互作用部位と一致し、Ubc9 のポリ SUMO 鎖形成能に関与していることが示唆されている⁷⁾。

6. E3 酵 素

ユビキチンの E3 酵素には RING 型と HECT 型の二つがあり、HECT 型では一度ユビキチン分子が E3 酵素に移してから基質へと付加されるが、RING 型ではそれは起こらない。一方、SUMO では基質によっては E3 酵素は必須でないと考えられていることなどから、E3 酵素は基質タンパク質、SUMO、Ubc9 を最適な位置に配向させるいわば補助的な役割が考えられている。SUMO の E3 酵素として、ユビキチン化 RING 型 E3 酵素と同様の RING フィンガードメインの SP-RING を持つ protein inhibitor of STAT1 (PIAS) 類に加えて、核膜孔形成因子である RanBP2、さらにポリコーム核小体に含まれる Pc2、Mms21、の 4 種類が見つかった⁸⁾。PIAS 類はユビキチン E3 酵素の RING 型のものと同様の反応機構を持っているが、RanBP2 および Pc2 は、ユビキチン E3 酵素の RING 型および HECT 型のいずれの反応機構にも似ていないことが明らかにされている^{9,10)}。また、近年では HDAC4 が Ubc9 および SUMO との相互作用により E3 様の作用を示しているという報告

があるが¹¹⁾、興味深いことに HDAC4 は SUMO 化基質であり、同時に SUMO 化による転写抑制におけるエフェクター因子としても機能する。SUMO における E3 酵素の役割は不明な点が多い。

7. プロセシング酵素、脱修飾酵素

UBL はしばしば前駆体として生産され、プロセシング酵素により C 末端 Gly-Gly 配列の直後で切断をうけ、成熟型となる (図 2)。このプロセシング反応と脱修飾反応は一般に似通った特異的な認識機構を持つシステインプロテアーゼ群により触媒される。SUMO のプロセシング・脱修飾酵素は酵母で ubiquitin-like protein specific proteases (Ulp)、哺乳類で sentrin-specific proteases (Senp) と呼ばれ、酵母で 2 種類、ヒトで 6 種類知られている。これは、高等真核生物で 100 以上見つかったユビキチン脱修飾酵素類と比べるとかなり少ない^{12,13)}。興味深いことに Ulp/Senp はユビキチンの脱修飾酵素の関連酵素ではなく、その由来をアデノウイルスのプロテアーゼに持つと考えられている^{12~14)}。UBL 脱修飾酵素のユビキチンフォールドに対する大まかな認識様式は Ulp/Senp 類においても同様に見られ、Gly-Gly 末端の切断という触媒機能にも大きな差異はない。ヒト Senp 類は Senp1-3, 5-7 (Senp4 は Senp3 と同じものであることが明らかになったため、欠番)であり、これらは酵母のホモログとの比較分類により Ulp1 のホモログである Senp1, 2, 3, 5 と Ulp2 のホモログである Senp6, 7 との 2 種類に分類できる。Ulp1 類に属するものは C 末端に配列保存性の高いプロテアーゼ触媒ドメインを、N 末端に多様性に富んだ配列を持つ。一方、Ulp2 類に属するものは触媒ドメインが二つに分かれ、50-200 残基程度の配列挿入が起きている (表 2)。Ulp/Senp 類の反応速度を支配するパラメータについては、SUMO のユビキチンフォールド部位が K_m に、C 末端配列の柔軟性が k_{cat} の決定に関与しているとの報告があり、特に C 末端配列の柔軟性は SUMO アイソフォーム間、前駆体 SUMO と付加型 SUMO 間の反応速度の違いに大きく影響を与えているとされている¹⁵⁾。また、Ulp/Senp は N 末端配列によって規定される細胞内局在の制御下ではじめて正常な働きを示し、これらの基質選択性、局在性がプロセシングおよび脱修飾反応制御、さらには SUMO 化全体の反応制御に関わっていると考えられている¹⁶⁾ (表 2)。

8. SUMO 化基質

SUMO 化を受ける基質タンパク質の多くは Ψ -Lys-X-Glu (Ψ は疎水性アミノ酸、X は任意のアミノ酸) のコンセンサス配列を持ち、この配列中の 2 番目のリジン残基が SUMO とのイソペプチド結合に供される。SUMOplot (www.abgent.com/doc/sumoplot) や SUMOsp (bioinformatics.

表 2 Senp アイソフォームの特性

系統	種類	ドメイン配置	長さ	細胞内局在	アイソフォーム選択性	反応特異性		
						前駆体処理	脱修飾	鎖切断
Ulp1	Senp1		643	核膜孔、核小体	SUMO-1/2/3	○	○	×
	Senp2		589	核膜孔	SUMO-1/2/3	○	○	×
	Senp3		574	核小体	SUMO-2/3	—	○	×
	Senp5		765	核小体	SUMO-2/3	—	○	×
Ulp2	Senp6		1112	核質	SUMO-2/3	×	×	○
	Senp7		984	核質	—	—	—	—

CD: 触媒ドメイン

lcd-ustc.org/sumosp/) はこの SUMO 化コンセンサス配列を指標に SUMO 化を受ける可能性がある配列の予測に利用できる Web サーバーである。これらを用いて SUMO 化サイトを予測すると、SUMO 化コンセンサス配列は 4 残基のみのアミノ酸配列から構成されることもあり、かなりの頻度でタンパク質一次配列上に現れる。これらが全て実際に SUMO 化を受けるとは考えにくく、それもあって、被修飾活性と共役した狭義のコンセンサス配列を定義する拡張コンセンサス配列として、phosphorylation-dependent SUMOylation motif (PDSM), negatively-charged amino acid-dependent SUMOylation motif (NDSM), synergy control (SC) motif などが提唱されている¹⁷⁾。一方、このようなコンセンサス配列を持たない基質タンパク質も見つかっている。図 4 にこれまで見つかった基質タンパク質の一部について、種類とその細胞内分布を示した。いくつかの細胞質タンパク質を除いて既知の基質タンパク質のほとんどは核に存在する。それらのタンパク質の作用は、転写制御、核小体の形成、クロマチン高次構造の制御、DNA 修復機構の制御、核膜孔輸送など核内現象全般に及ぶ¹⁸⁾。また、SUMO 化基質として NF- κ B の抑制因子の I- κ B や、日周期制御タンパク質 BMAL1、細胞膜上の kinate receptor など細胞質での役割を示唆するものもいくつか報告されている。さらに、ウイルスが細胞に感染した際に導入されるウイルス由来のタンパク質に対して SUMO 化が起きる事象も数多く報告されている¹⁹⁾。このように SUMO 化基質タンパク質は多岐にわたり、SUMO 化の効果も基質依存的で多様であると思われる。

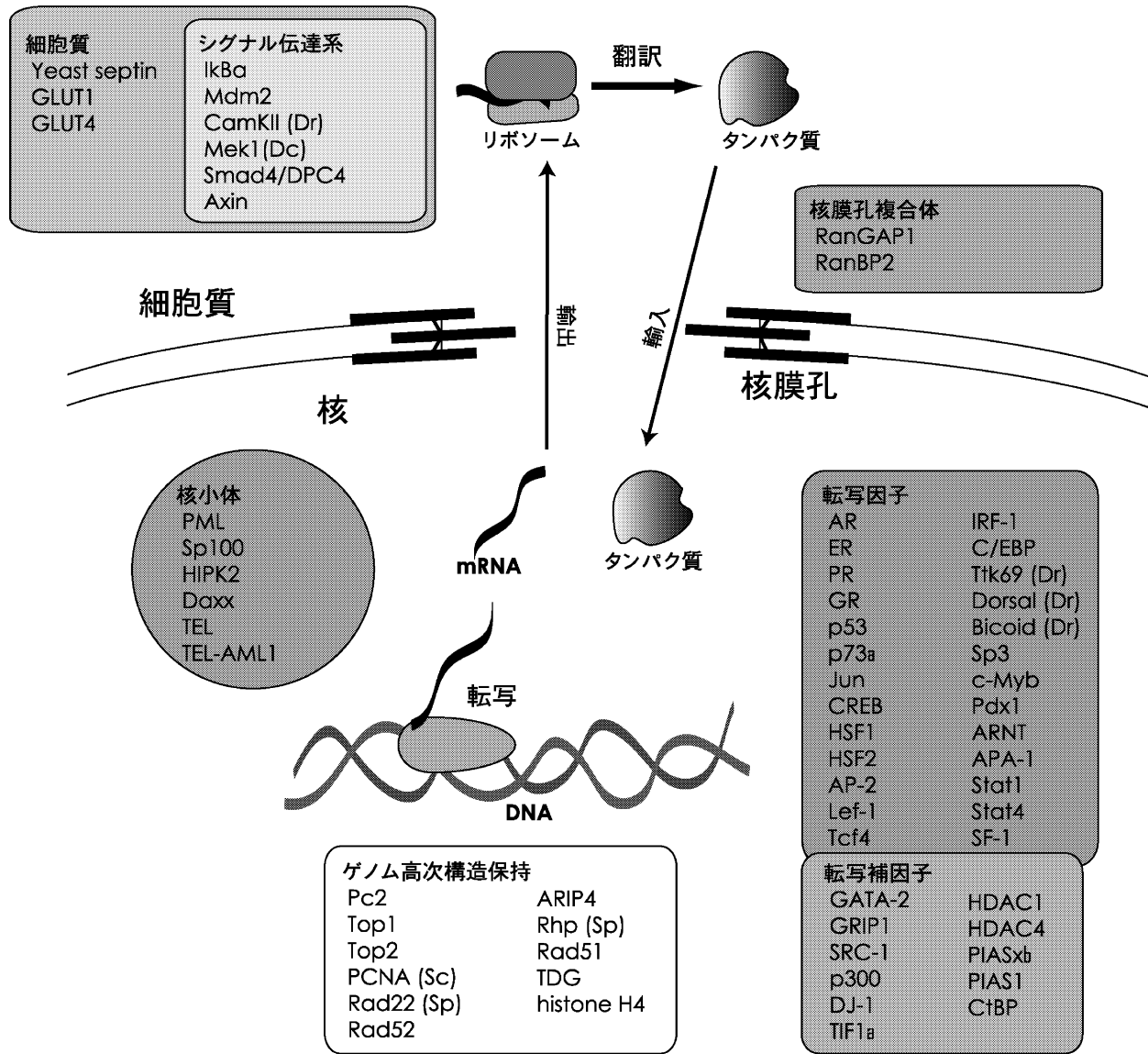
9. 転写関連因子の SUMO 化と転写調節

SUMO の基質タンパク質として同定されているものの多くは転写関連因子である。多くの場合これらの転写因子の SUMO 化コンセンサス配列のリジンをアルギニンへと変異させると転写活性の上昇が見られる。幾つかの例にお

いて逆に転写活性が低下する場合も観察されている²⁰⁾。複数の転写因子応答配列が存在する時には SUMO 化の転写制御効果はさらに複雑になり、同一の転写因子の応答配列が DNA 上に複数並んでいる場合でも、C/EBP および Ad4BP は SUMO 化によって転写抑制が起きるが、反対にグルココルチコイド受容体ではこの場合に転写活性の大幅な上昇が見られるとの報告がある^{21~23)}。SUMO 化によるこれらの転写関連因子への効果としては DNA 結合の阻害、抑制因子の召集、抑制ドメインの安定化、転写因子の局在性の変更、補因子の召集、DNA 結合の安定化等が考えられる。補因子の召集等の効果に関しては、SUMO 化によって召集される転写補因子として histone deacetylases (HDACs) や転写不活性化因子の Daxx が知られている。HDAC 類では、HDAC1 が SUMO1 化ヒストン H4 タンパク質と、HDAC2 が SUMO 化 Elk-1 と、HDAC3 が SUMO 化 PPAR γ と、HDAC6 が SUMO 化 p300 とそれぞれ親和性を持つことが知られる²⁰⁾。Daxx については、Daxx 上の SUMO 親和性モチーフである SUMO interacting motif (SIM) 配列を介した SUMO との結合により、転写抑制を起こす可能性が提唱されている²⁴⁾。また SUMO 化に関係するが SUMO によらない転写抑制機構が存在する。E2 酵素 Ubc9 および E3 酵素 PIAS による SUMO 非依存的な転写制御である。E3 酵素の一つである PIAS は元来 Stat1 の抑制因子として発見された。PIAS は Stat1 の SUMO 化を促進するが、SUMO 化自体の効果はさほど大きくない一方で、PIASy はアンドロゲン受容体の転写抑制を、PIASx は Fli-1 の転写抑制を SUMO 非依存的に行う²⁵⁾。Ubc9 についても SUMO 非依存的な転写調節機構が知られており²⁶⁾、これらの修飾酵素が SUMO 化依存的、非依存的の両方の経路を通じて転写制御に関わっていることが分かる。

10. ゲノムの構造維持

哺乳類の UBC9 のノックアウトマウスは初期胚致死で、



* Dc: タマホコリカビ, Dr: ショウジョウバエ, Sc: 出芽酵母, Sp: 分裂酵母

図 4 SUMO 化基質の種類と分布

様々なタンパク質が SUMO 化を受ける。既知の基質の多くは核内に分布し、中でも転写調節因子にその多くが分類される。

そのような細胞ではクロマチン分離異常が起きていると報告されている²⁷⁾。このことから SUMO 化が核内構造の高次構造形成に大きな役割を持っていることが予想される。promyelocytic leukemia タンパク質 (PML) は PML 核小体, PML oncogene domain (PODs), nuclear domain 10 (ND10) と呼ばれる核小体の主要構成成分で, SUMO 化基質タンパク質の中でも初期から研究されてきたものの一つである。通常, 細胞は核 1 個につき 5-10 個の PML 核小体を含んでおり, その形成には PML の二量体化, SUMO 化および PML 上の SIM 配列を介した SUMO-SIM 配列間の相互作用の三つの存在が不可欠であることが明らかになった²⁸⁾。PML 核小体には免疫系の監視, インターフェロン

の機能の仲介, アポトーシスの制御, 腫瘍の抑制等の様々な経路における制御機能が備わっており, これらの活性は Sp100, Sp140, CBP, BLM, Daxx, pRB などの PML 核小体に集積する因子に起因するとされる。そしてこれら因子の集積は SUMO と SUMO 親和性モチーフの SIM との相互作用により制御されると考えられている²⁹⁾。転写調節因子, 修飾因子等の PML への集積は, 転写因子のプロモーター領域からの隔離や修飾因子の PML 内での特異的反応等を引き起こすとされる²⁸⁾。また最近では, 核マトリックスと PML 核小体との関係が注目されている。クロマチンループの形成に関与する SATB1 は, SUMO 化 PML と共に DNA 上の matrix attachment region (MAR) と共局在し

て核マトリックスへの DNA のアンカーリングを行っている³⁰⁾。逆にショウジョウバエにおける *gypsy* の SUMO 化はインスレーター構造体を形成する因子の集合を妨げ、クロマチンループ構造の形成を著しく阻害することが分かっている³¹⁾。さらに、CpG アイランドのメチル化を介したヘテロクロマチン構造の誘起に関与する MBD1 と MCAF1 の相互作用は、SUMO 化 MBD1 と MCAF1 上の SIM 配列との結合が中心的な役割を担っている³²⁾。これらに加え、SUMO 化はヒストンの修飾、テロメア伸長への関与、トポイソメラーゼの制御などに関与し³³⁾、これらの項目を含めて核内で重要な機能を果たしていると考えられる。

11. ユビキチン修飾と SUMO 化

以前から言及されてきた SUMO の一つの大きな役割は、ユビキチン-プロテアソーム分解系の阻害である。SUMO 化はユビキチン化と異なり、基質の分解促進効果がないことからユビキチン化を拮抗阻害することで基質の分解を抑える作用があると考えられてきたからである。確かに、NF- κ B 制御機構において SUMO 化はユビキチン化と拮抗することで NF- κ B 制御因子である I- κ B の分解抑制に寄与する。しかし、Carter らの報告では、p53 の制御における SUMO 化とユビキチン化は、単純な拮抗阻害としては捉えられないことを示している。そこでは、ユビキチン E3 酵素の濃度依存的なポリユビキチン鎖形成は p53 を分解へ、モノユビキチン化修飾は SUMO 化 E3 の召集を促し、SUMO 化による p53 の核外輸出へと導くという機序で起こることが示されている³⁴⁾。ここでの SUMO 化の効果はユビキチン化との拮抗による p53 の分解阻害ではなく、あくまでユビキチン化の制御の下での受動的な p53 の局在調節である。p53 の例においては、UBL 修飾の一つである Nedd8 の関与も示されており、従ってこの系においてはモノユビキチン化、ポリユビキチン化、SUMO 化、Nedd8 化の四つの UBL 修飾が一つのタンパク質に協調的に働いていることになる。ほかにも PCNA におけるモノユビキチン化、K63 リンクポリユビキチン化、SUMO 化の共役や、IKK/NEMO における SUMO 化とポリユビキチン化も、多種の UBL 修飾が一つの基質タンパク質に働く例としてあげられる³⁵⁾。このように UBL 修飾はいくつもの UBL 修飾を共役させることでさらに高次の制御機構を獲得していると言える。

12. SUMO のポリ化

ポリユビキチン化には 48 番目と 63 番目のリジンに新たなユビキチン分子が修飾付加することでポリユビキチン鎖を形成する K48 リンクポリユビキチンと K63 リンクポリユビキチンがよく知られており、前者はサブユニット間にイソペプチド結合以外の相互作用をある程度持つが、後者

は持たない^{36,37)}。SUMO でもユビキチン同様に、SUMO2/3 は生体内でポリ化反応が起こり、SUMO1 も試験管内のみではあるが、ポリ SUMO 鎖の形成が可能である³⁸⁾。しかしながら、ポリ SUMO 化に関する解析報告はごくわずかな³⁹⁾。また、ユビキチンにおいては特定のパターンのポリ鎖形成に機能する E2 酵素や、鎖の伸長に関与すると考えられている E4 因子の存在⁴⁰⁾が確認されているが、SUMO 化におけるそれらの因子の存在や、ポリ SUMO 化自体の意義についてはあまり明らかにはなっていない。

13. SUMO 化の構造学的研究と作用機構の解明

SUMO 化に関わるいくつかの現象について SUMO 化がどのような結果をもたらすかを述べた。では、このような効果は SUMO 分子の立体構造の観点からどのように説明できるのだろうか。現在、SUMO 化タンパク質の立体構造解析例はわずか三つの系でしか報告されていない。したがって立体構造から SUMO の作用機序の詳細を理解することは健全な論理の範囲を超えるが、これら三つの構造は先に述べた SUMO の作用機序のそれぞれ異なる修飾基-基質間の関係性を備えている。SUMO 化 E2-25K の構造解析結果⁴¹⁾は E2-25K と SUMO の間の非共有結合的な相互作用表面が小さく、両者はほぼ共有結合部分のみで繋がれていることを示す。ここでは SUMO が E2-25K と Uba1 の結合部位に付加することで E2-25K の Uba1 との相互作用表面を遮蔽していると考えられている。同様に SUMO 化 RanGAP1 においても、SUMO と基質タンパク質間の非共有結合的な相互作用表面は小さいが、状況は少し違っている。この SUMO 化 RanGAP1 を含む SUMO-RanGAP1-Ubc9-RanBP2 断片の 4 者複合体の立体構造⁴²⁾ (図 5) においては、RanBP2 断片は RanGAP1 と直接相互作用しておらず、SUMO および UBC9 との結合を介して複合体形成に加わっている。従って、SUMO はこの複合体中において RanGAP1 に RanBP2 との新たな結合表面を追加するタグとして機能していると捉えることができる。一方で、SUMO と基質タンパク質との相互作用表面が大きい場合にはどうなるのか。SUMO 化を受けたチミン DNA グリコシラーゼ (TDG) の中央領域の構造解析がこのような SUMO 化の状態を示している。SUMO と基質タンパク質の TDG が相互作用し SUMO は TDG 中央領域中の C 末端領域との間で β シート構造を持つ。C 末端領域にはこの β シートと SUMO 化部位の間に分子表面に突出した $\alpha 7$ ヘリックスを持つ。立体構造モデリングによる考察からこの $\alpha 7$ ヘリックスは DNA 分子と衝突する位置にあることから、SUMO 化前ではうまく解離することができなかった TDG と反応生成物の基質 DNA との強固な相互作用が、SUMO 化された状態では $\alpha 7$ ヘリックスと DNA の立体衝突効果により弱められ、DNA を解離させるというモデル

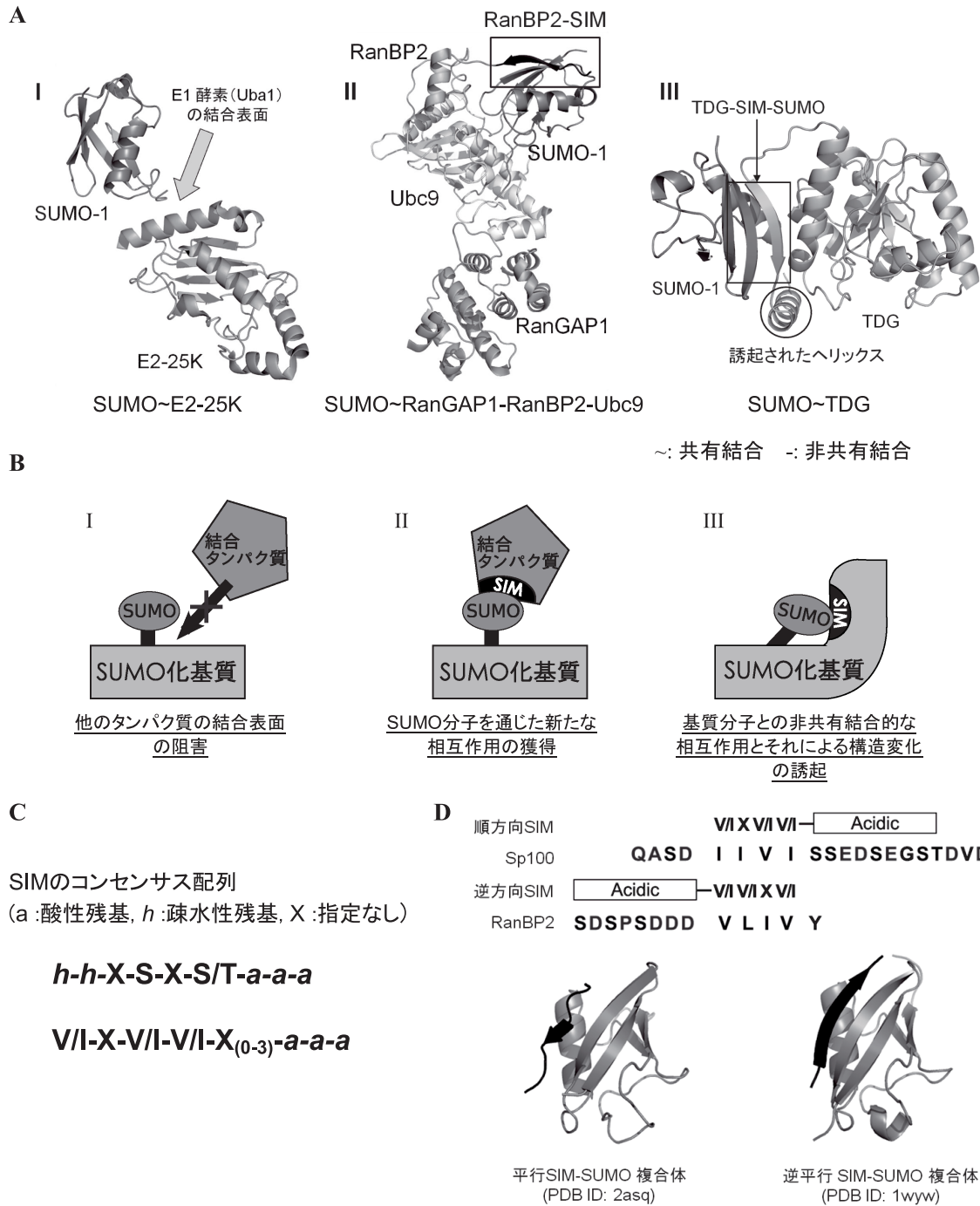


図5 SUMO化タンパク質の構造とSUMOの作用機構

(A) SUMO化タンパク質の構造解析例。(I) SUMO化E2-25KはSUMO化によりUba1との相互作用表面を遮蔽される(PDB ID: 2bf8)。(II) RanBP2はSUMO-SIM相互作用を介して間接的にRanGAP1と相互作用している(PDB ID: 1z5s)。(III) SUMO化TDG中央領域はSUMO-SIM間の分子間βシートとC末端αヘリックスを持つ(PDB ID: 1wyw)。(B) SUMO化の基質への作用モデル。(A)の構造をもとにSUMOは、(I)他のタンパク質の結合表面の阻害、(II)SUMO分子を通じた新たな相互作用の追加、(III)基質タンパク質の構造変化の誘起、を行う可能性が考えられる。(C) SIMのコンセンサス配列。二つのSIMコンセンサス配列が知られている。現在ではV/I-X-V/I-V/Iを中心とした配列を持つ下側の配列が主流である。(D) SIMの一次配列上の方向性と立体構造上での方向性。SIMには酸性残基クラスターの位置により順方向と逆方向のものがある。立体構造においても平行と逆平行分子間βシートの二つが報告されている。

が提唱されている⁴³⁾。

14. SUMO interaction motif (SIM)

ユビキチンではドメイン性のものを主体として 13 種類ものユビキチン相互作用ドメイン (ubiquitin-interacting domain: UID) がみつかつていてのに対し、SUMO においては E1-E2 酵素や Senp が用いる認識様式を除いては、SIM が唯一 SUMO 認識ドメインとして同定されている。今のところ、SIM 配列コンセンサスとして二つのバリエーションが提唱されている。一つ目はセリン・トレオニン残基を中心とし、疎水性アミノ酸と酸性アミノ酸とに挟まれたモチーフ⁴⁴⁾、二つ目は Val/Ile 残基を中心とし、場合によっては酸性残基を周辺に含むモチーフである⁴⁵⁾。どちらも疎水性アミノ酸からなるモチーフであることは変わらないが、前者は Song らによって後者が提唱された際にその機能性は明確ではない。従って、今のところ SIM 配列と言うと後者を示すと考えてよい。SIM と SUMO の相互作用様式は SUMO と PIASx-SIM の複合体の構造解析などによって明らかとなっており⁴⁶⁾、SIM は SUMO の $\alpha 1$ と $\beta 2$ の間にできる疎水性グルーブに結合し、 $\beta 2$ との間に平行もしくは逆平行 β シートを形成する (図 5)。この作用機構は先に述べたように RanBP2-SUMO 間、TDG-SUMO 間にも見られるのに加え、SUMO-Sae1-Sae2 (E1 酵素) 複合体上での SUMO の N 末端配列と SUMO のユビキチンフォールド部位との相互作用にも観察されている⁴⁷⁾。これら四つの複合体構造で興味深いのは、他の三つに見られる分子間 β シートの方向は逆平行であるのに対して PIASx-SIM と SUMO のものは平行であることである。同時に、SIM 配列には酸性アミノ酸クラスターが C 末端側に続く順方向と N 末端側に先行する逆方向の 2 種類があり、この酸性クラスターが SUMO 上の塩基性の部位と会合することで β シートと SIM の方向を決定する可能性が指摘されている⁴⁶⁾。酵母ツーハイブリッド試験により相当数の SIM 配列が確認され、構造解析結果からも SIM 有効性は確かである。しかし、あまりにも短いこの配列にユビキチン相互作用ドメイン (UID) 同様の機能上の選択性を認めることができるのか疑問に思われる。酵母ツーハイブリッド試験を用いた実験により SIM は SUMO アイソフォームに対して何らかの選択性を持ちうる事が示されている。その機構は明らかではないが、SUMO アイソフォーム間で SIM が認識する疎水性グルーブと酸性残基が結合する塩基性クラスターとの位置関係および電荷状態が若干異なっていることを利用して、SIM の選択性が発生する可能性が示唆されている⁴⁸⁾、SIM はすでに述べた Daxx, PML, MCAF1, TDG などの機能に重要な機能を果たしていると考えられている。

15. SUMO の作用機序モデル

最後に SUMO の作用機序を考察して本稿を締めくくりたい。SUMO の基質への構造的な作用として、基質タンパク質表面の遮断をするか否か (E2-25K)、他の分子の召集のためのタグとなりうるか (RanGAP1)、SUMO が基質と非共有的な相互作用を持ち、それにより構造変化を誘起する可能性があるか (TDG) の三つがポイントとなる (図 5A, B)。即ち作用機序の分類には、1) 基質タンパク質上の SUMO は、他の修飾との拮抗を含めたタンパク質相互作用を阻害しうるか、2) SUMO は SIM を持つ第三者タンパク質もしくは、修飾酵素群の招集を行いうるか、3) 基質タンパク質が SIM を持つ場合は、SUMO との β シート形成による基質タンパク質の構造変化が考えられるか、が指標となり得る⁴⁹⁾ (図 5)。こういった作用モデルの一般性は今後の機能・立体構造解析により評価されるが、今のところ基質タンパク質や下流因子の配列上の SIM の有無が、SUMO 化の効果を予測するのにある程度有効かもしれない。

文 献

- 1) Saitoh, H., Pu, R.T., & Dasso, M. (1997) *Trends Biochem. Sci.*, **22**, 374-376.
- 2) Tanaka, K., Suzuki, T., & Chiba, T. (1998) *Mol. Cells*, **8**, 503-512.
- 3) Owerbach, D., Pina, L., & Gabbay, K.H. (2004) *Diabetes*, **53**, 1890-1893.
- 4) Pickart, C.M. & Eddins, M.J. (2004) *Biochim. Biophys. Acta*, **1695**, 55-72.
- 5) Huang, D., Hunt, H., Zhuang, M., Ohi, M., Holton, J., & Schulman, B. (2007) *Nature*, **445**, 394-398.
- 6) Knipscheer, P., van Dijk, W.J., Olsen, J.V., Mann, M., & Sixma, T.K. (2007) *EMBO J.*, **26**, 2797-2807.
- 7) Capili, A.D. & Lima, C.D. (2007) *J. Mol. Biol.*, **369**, 608-618.
- 8) Heun, P. (2007) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **19**, 350-355.
- 9) Kagey, M.H., Melhuish, T.A., Powers, S.E., & Wotton, D. (2005) *EMBO J.*, **24**, 108-119.
- 10) Pichler, A., Knipscheer, P., Saitoh, H., Sixma, T.K., & Melchior, F. (2004) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**, 984-991.
- 11) Zhao, X., Sternsdorf, T., Bolger, T., Evans, R., & Yao, T. (2005) *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 8456-8464.
- 12) Mukhopadhyay, D. & Dasso, M. (2007) *Trends Biochem. Sci.*, **32**, 286-295.
- 13) 八代田英樹, 小松雅明 (2006) 蛋白質 核酸 酵素, **51**, 1173-1182.
- 14) Li, S. & Hochstrasser, M. (1999) *Nature*, **398**, 246-251.
- 15) Reverter, D. & Lima, C.D. (2006) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **13**, 1060-1068.
- 16) Melchior, F., Schergaut, M., & Pichler, A. (2003) *Trends Biochem. Sci.*, **28**, 612-618.
- 17) Yang, S.H., Galanis, A., Witty, J., & Sharrocks, A.D. (2006) *EMBO J.*, **25**, 5083-5093.
- 18) Seeler, J.S. & Dejean, A. (2003) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*,

- 4, 690–699.
- 19) Wilson, V. & Rangasamy, D. (2001) *Virus Res.*, **81**, 17–27.
- 20) Gill, G. (2005) *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **15**, 536–541.
- 21) Le Drean, Y., Mincheneau, N., Le Goff, P., & Michel, D. (2002) *Endocrinology*, **143**, 3482–3489.
- 22) Subramanian, L., Benson, M., & Iñiguez-Lluhi, J. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 9134–9141.
- 23) Komatsu, T., Mizusaki, H., Mukai, T., Ogawa, H., Baba, D., Shirakawa, M., Hatakeyama, S., Nakayama, K.I., Yamamoto, H., Kikuchi, A., & Morohashi, K. (2004) *Mol. Endocrinol.*, **18**, 2451–2462.
- 24) Lin, D., Huang, Y., Jeng, J., Kuo, H., Chang, C., Chao, T., Ho, C., Chen, Y., Lin, T., Fang, H., Hung, C., Suen, C., Hwang, M., Chang, K., Maul, G., & Shih, H. (2006) *Mol. Cell*, **24**, 341–354.
- 25) Sachdev, S., Bruhn, L., Sieber, H., Pichler, A., Melchior, F., & Grosschedl, R. (2001) *Genes Dev.*, **15**, 3088–3103.
- 26) Kobayashi, S., Shibata, H., Kurihara, I., Yokota, K., Suda, N., Saito, I., & Saruta, T. (2004) *J. Mol. Endocrinol.*, **32**, 69–86.
- 27) Nacerddine, K., Lehembre, F., Bhaumik, M., Artus, J., Cohen-Tannoudji, M., Babinet, C., Pandolfi, P.P., & Dejean, A. (2005) *Dev. Cell*, **9**, 769–779.
- 28) Shen, T., Lin, H., Scaglioni, P., Yung, T., & Pandolfi, P. (2006) *Mol. Cell*, **24**, 331–339.
- 29) Zhong, S., Muller, S., Ronchetti, S., Freemont, P.S., Dejean, A., & Pandolfi, P.P. (2000) *Blood*, **95**, 2748–2752.
- 30) Kumar, A., Srivastava, S., & Hosur, R.V. (2007) *J. Mol. Biol.*, **367**, 1480–1493.
- 31) Capelson, M., & Corces, V.G. (2006) *EMBO J.*, **25**, 1906–1914.
- 32) Uchimura, Y., Ichimura, T., Uwada, J., Tachibana, T., Sugahara, S., Nakao, M., & Saitoh, H. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 23180–23190.
- 33) Gill, G. (2004) *Genes Dev.*, **18**, 2046–2059.
- 34) Carter, S., Bischof, O., Dejean, A., & Vousden, K.H. (2007) *Nat. Cell Biol.*, **9**, 428–435.
- 35) Ulrich, H.D. (2005) *Trends Cell Biol.*, **15**, 525–532.
- 36) Tenno, T., Fujiwara, K., Tochio, H., Iwai, K., Morita, E., Hayashi, H., Murata, S., Hiroaki, H., Sato, M., Tanaka, K., & Shirakawa, M. (2004) *Genes Cells*, **9**, 865–875.
- 37) Varadan, R., Assfalg, M., Haririnia, A., Raasi, S., Pickart, C., & Fushman, D. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 7055–7063.
- 38) Mao, Y., Sun, M., Desai, S., & Liu, L. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **97**, 4046–4051.
- 39) Sramko, M., Markus, J., Kabat, J., Wolff, L., & Bies, J. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 40065–40075.
- 40) Hatakeyama, S. & Nakayama, K.I. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **302**, 635–645.
- 41) Pichler, A., Knipscheer, P., Oberhofer, E., van Dijk, W.J., Kerner, R., Olsen, J.V., Jentsch, S., Melchior, F., & Sixma, T.K. (2005) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **12**, 264–269.
- 42) Reverter, D. & Lima, C. (2005) *Nature*, **435**, 687–692.
- 43) Baba, D., Maita, N., Jee, J.G., Uchimura, Y., Saitoh, H., Sugawara, K., Hanaoka, F., Tochio, H., Hiroaki, H., & Shirakawa, M. (2005) *Nature*, **435**, 979–982.
- 44) Minty, A., Dumont, X., Kaghad, M., & Caput, D. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 36316–36323.
- 45) Song, J., Durrin, L.K., Wilkinson, T.A., Krontiris, T.G., & Chen, Y. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **101**, 14373–14378.
- 46) Song, J., Zhang, Z., Hu, W., & Chen, Y. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 40122–40129.
- 47) Lois, L.M. & Lima, C.D. (2005) *EMBO J.*, **24**, 439–451.
- 48) Hecker, C.M., Rabiller, M., Haglund, K., Bayer, P., & Dikic, I. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 16117–16127.
- 49) 馬場大地, 白川昌宏 (2006) 蛋白質 核酸 酵素, **51**, 1201–1205.